

Application of hydroxyethyl puerarin in preparation of new medicine for curing cerebrovascular diseases

Publication number: CN1394603

Also published as:

Publication date: 2003-02-05

 CN1186026C (C)

Inventor: ZUO CHUNXU (CN); ZHANG XIUMEI (CN); ZHONG YING (CN)

Applicant: SHAANXI ZHENPING PHARMACEUTICA (CN)

Classification:

- international: A61K31/353; A61K31/7048; A61P9/10; A61K31/352; A61K31/7042; A61P9/00; (IPC1-7): A61K31/353; A61P9/10

- European:

Application number: CN20021035352 20020809

[Report a data error here](#)

Priority number(s): CN20021035352 20020809

Abstract of CN1394603

The present invention relates to a new compound hydroxyethylated puerarin, and is characterized by that the puerarin can be extracted from the Chinese medicinal material pueraria root, then the puerarin is undergone the process of hydroxyethylation treatment so as to obtain the puerarin derivative with a certain physiological activity, i.e. said invented hydroxyethylated puerarin which can be used for preparing new medicine for curing cerebrovascular disease. Said invention also provides its structure formula.

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02135352.2

[43] 公开日 2003 年 2 月 5 日

[11] 公开号 CN 1394603A

[22] 申请日 2002.8.9 [21] 申请号 02135352.2

[71] 申请人 陕西镇坪制药厂

地址 725600 陕西省镇坪县城关

[72] 发明人 左春旭 张岫美 仲 英 杨尚军
王姿颖 王 菊 谌建强 黎安国
刘吉开[74] 专利代理机构 山东济南齐鲁科技专利事务所有
限公司

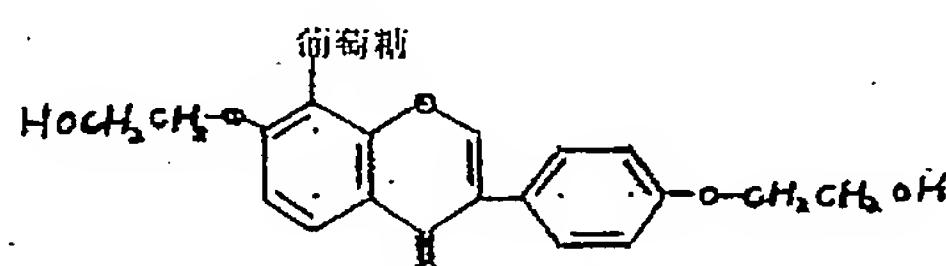
代理人 王井养

权利要求书 1 页 说明书 9 页

[54] 发明名称 羟乙葛根素在制备治疗脑血管病新
药中的应用

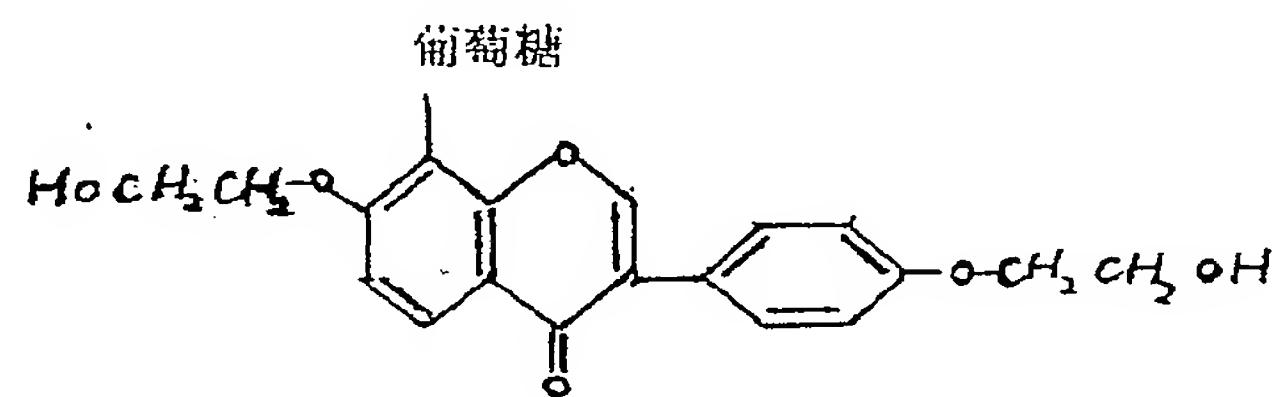
[57] 摘要

一种从葛根中提取的葛根素，再用羟乙基化方法得到一种具有生理活性的葛根素衍生物。经结构鉴定该化合物为羟乙葛根素，其结构式为：该化合物可用于制备治疗脑血管病的新药。



ISSN 1008-4274

1、一种具生理活性的葛根素衍生物，是具有如下结构的羟乙葛根素：



该化合物用于制备治疗脑血管病新药。

2、应用羟乙葛根素制备成治疗脑血管病的羟乙葛根素注射液和粉针剂。

3、应用羟乙葛根素制备成治疗脑血管病的羟乙葛根素口服制剂。

羟乙葛根素在制备治疗脑血管病新药中的应用

本发明涉及医药领域，是关于葛根素衍生物在制备治疗脑血管病新药中的应用。

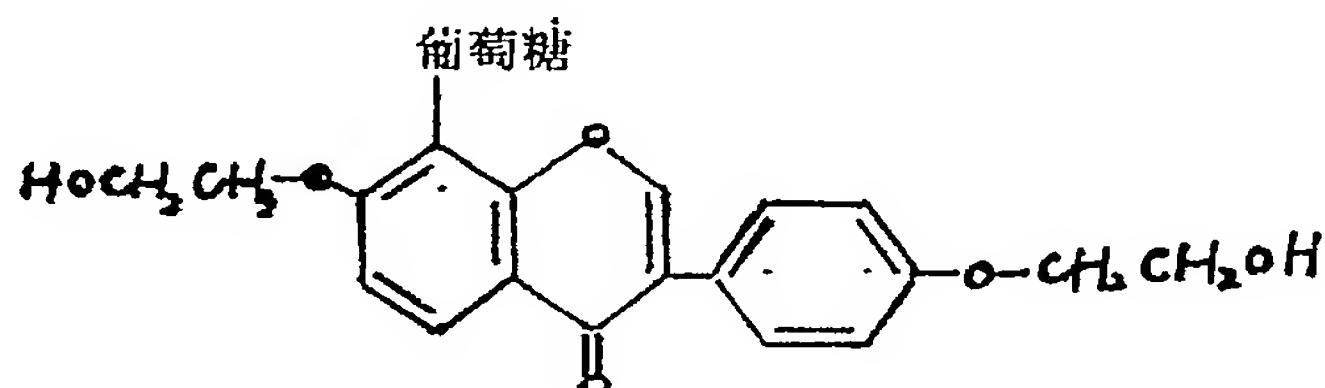
缺血性脑血管病是严重危害人类健康的疾病之一，在人群中具有发病率、致残率、死亡率高的特点。自从烈性传染病被基本控制以来，缺血性脑血管病一直是三大死亡疾病之一。据统计，在我国每年约有 150 万人罹患此病，约有 100 万人因该病致死，严重危害人类健康，威胁着国民经济的迅速发展。

葛根素是 1993 年卫生部批准的治疗心、脑血管病的新药，上市以后，对防治心、脑血管病起到积极作用，社会效益、经济效益显著。2000 年底，葛根素及其注射液的生产、销售已突破 2 亿元。

但在研究、开发葛根素时，即已发现该品在肠胃道中较难吸收，在申报新药资料中，山东省医科院放射所的<[H³]葛根素药代动力学实验报告>中提出：本品虽能通过血脑屏障进入脑内，但含量较低，难于充分发挥对脑血管的生理活性。新药上市后，很多学者采用体内、体外等各种试验方法，也对葛根素的作用机理和其他生理活性进行研究，均提出增加口服血药浓度和血脑屏障通过率的要求。

本发明的目的在于提供一种可提高葛根素的口服血药浓度和血脑屏障通过率较高的治疗脑血管病新药。

本发明的解决方案是由中药葛根中提取葛根素采用羟乙基化方法在葛根素基础上引入侧链，改造成具生理活性的葛根素衍生物，该化合物是具有如下结构的羟乙葛根素。



英文名为 Hydroxyethylpuerarin，简写为 HEP；

化学名为：8-C- β -D-吡喃葡萄糖-7, 4-羟乙氧异黄酮

英文化学名为：8-C- β -D-glucopyranosyl-7,4'-dihydroxyethylxylosylated isoglavone.

用紫外、红外、质谱，H-核磁共振谱和 13C-核磁共振谱对该化合物的结构进行了鉴定。并以高效液相色谱法测定其含量按干燥品计 $\geq 97.0\%$ 。

将葛根素的两个酚羟基改变为两个酚羟乙基的设计目的，是想增加其脂溶性，以便提高葛根素对血脑屏障通过率。用实验比较了葛根素与羟乙葛根素在水中的溶解度差异，结果见表1。

表 1 在水中溶解度比较

	葛根素	羟乙葛根素
水中溶解量 (mg) *	39.96	37.04

*在 25°C, 10ml 蒸馏水中溶解量

实验结果表明，经改造后的羟乙葛根素，其水溶性的减少，标志着其脂溶性的升高，也将提高其血脑屏障通过率，而广泛用于脑血管病的治疗。

进一步探讨了化合物羟乙葛根素治疗脑血管病的作用机理。实验采用血管内栓线阻断法造成大鼠大脑中动脉区可逆性脑缺血再灌注损伤模型，通过测定血浆内皮素水平、脑组织亚细胞水平的生化指标测定、流式细胞学和病理组织学检查，研究脑缺血再灌注损伤后各项指标的变化及化合物羟乙葛根素对其影响，观察了该化合物对局灶性脑缺血再灌注损伤的保护作用。实验结果如下：

实验一、化合物 HEP 急性毒性研究

各组动物均未见明显中毒表现，即无法测得 LD₅₀ 值，即以最高剂量 200mg/ml 和最大容积 0.5ml 一次给予 20 只小鼠（雌雄各半），观察 72 小时，无明显死亡毒性。按每只动物 20g 计，该化合物的 LD₅₀>5g/kg。

实验二、梗死指标观察

1、Longa's 五分制评分检测神经运动功能障碍，结果显示，缺血损伤组神经障碍评分显著高于假手术组 (P<0.05)。见表 2。

表 2 大鼠大脑中动脉阻断 1 小时后神经损伤分级 (x±s)

分 组	动物数	神经学评价
假手术组 (sham)	5	0.4±0.5477
缺血组 (IR)	5	2.4±1.1400**

与假手术组比较，**P<0.01

2、TCC 染色观察梗死组织：结果显示，假手术组脑组织呈玫瑰红色，缺血再灌注组则可见多个白色梗死灶。

实验三、化合物 HEP 对大鼠大脑中动脉区局灶性脑缺血再灌注损伤血浆内皮素水平的影响。

结果见表 3。结果表明大鼠局灶性脑缺血 1 小时，再灌注 48 小时，血浆内皮素水平显著升高 ($P<0.01$)。低、中剂量的化合物 HEP 均可显著降低血浆内皮素水平 (均为 $P<0.01$)，高剂量的化合物 HEP 有降低血浆内皮素水平的趋势，但无统计学意义。

表 3 化合物 HEP 对大鼠大脑中动脉阻塞 (MCAO) 引起的局灶性脑缺血损伤血浆内皮素 (ET) 水平的影响 (pg/ml, $\bar{x} \pm s$)

分组	剂量	n	ET
Sham+NS	2ml/kg	10	117.1±11.93
IR+NS	2ml/kg	10	141.0±1.686 ^{##}
IR+nim	0.4ml/kg	10	116.6±10.64**
IR+HEP	15/kg	10	119.2±15.16**
IR+HEP	30ml/kg	10	119.6±16.10**
IR+HEP	60ml/kg	10	128.4±20.39

注：IR：缺血再灌注组；nim：nimodipine；

* $P<0.05$ ，** $P<0.01$ vs 假手术组；* $P<0.05$ ，** $P<0.01$ vs IR

实验四、化合物 HEP 对大鼠大脑中动脉区局灶性脑缺血再灌注损伤脑组织 MDA 含量的影响。

结果见表 4、5、6。结果表明大鼠局灶性脑缺血 1 小时，再灌注 48 小时，脑组织匀浆、胞浆和线粒体中 MDA 水平显著升高 (分别为 $P<0.001$, $P<0.01$, $P<0.01$)。化合物 HEP 低、中、高剂量组均可显著降低脑组织匀浆中的 MDA 水平 (均为 $P<0.001$)；化合物 HEP 各剂量组均可显著降低胞浆中的 MDA 水平 (均为 $P<0.001$)；化合物 HEP 低、中剂量组可显著降低线粒体 MDA 水平 (分别为 $P<0.05$, $P<0.01$)，化合物 HEP 高剂量组有降低线粒体 MDA 水平的趋势，但无统计学意义。

表 4 化合物 HEP 对大鼠 MCAO 引起的局灶性脑缺血损伤
伤血浆丙二醛 (MDA) 水平的影响 (nM/mgpr, $\bar{x} \pm s$)

分组	剂量	动物数	丙二醛 (MDA)
Sham+NS	2ml/kg	10	2.913 \pm 1.371
IR+NS	2ml/kg	10	5.599 \pm 1.267 ^{##}
IR+nim	0.4ml/kg	10	3.259 \pm 1.504 ^{**}
IR+HEP	15ml/kg	10	1.804 \pm 0.578 ^{**}
IR+HEP	30mg/kg	10	2.518 \pm 0.8828 ^{**}
IR+HEP	60mg/kg	10	2.642 \pm 0.5464 ^{**}

#P<0.05, ##P<0.01 vs sham; **P<0.05, **P<0.01 vs IR

表 5 化合物 HEP 对大鼠 MCAO 引起的局灶性脑缺血损伤
伤胞浆丙二醛 (MDA) 水平的影响 (nM/mgpr, $\bar{x} \pm s$)

分 组	剂 量	动 物 数	丙二醛 (MDA)
Sham+NS	2ml/kg	10	1.531 \pm 0.5089
IR+NS	2l/kg	10	2.789 \pm 0.9216 ^{##}
IR+nim	0.4ml/kg	10	1.089 \pm 0.3141 ^{**}
IR+HEP	15ml/kg	10	0.9427 \pm 0.3639 ^{**}
IR+HEP	30ml/kg	10	0.9807 \pm 0.3051 ^{**}
IR+HEP	60ml/kg	10	1.127 \pm 0.2738 ^{**}

#P<0.05, ##P<0.01 vs sham 组; *P<0.05, **P<0.01 vs IR 组

表 6 化合物 HEP 对大鼠 MCAO 引起的局灶性脑缺血损伤
线粒体内的醛 (MDA) 水平的影响 (nM/mgpr, $\bar{x} \pm s$)

分 组	剂 量	动 物 数	丙二醛 (MDA)
Sham+NS	2ml/kg	10	5.609 \pm 2.443
IR+NS	2ml/kg	10	13.55 \pm 5.520 ^{##}
IR+nim	0.4ml/kg	10	8.666 \pm 2.697*
IR+HEP	15ml/kg	10	8.761 \pm 3.810*
IR+HEP	30ml/kg	10	5.751 \pm 1.754 ^{**}
IR+HEP	60ml/kg	10	10.65 \pm 2.226

#P<0.05, ##P<0.01 vs sham 组; *P<0.05, **P<0.01 vs IR 组

实验五、化合物 HEP 对大鼠大脑中动脉区局灶性脑缺血再灌注损伤脑组织总抗氧化能力的影响。

结果见表 7、8、9。结果表明大鼠局灶性脑缺血 1 小时，再灌注 48 小时，脑组织匀浆、胞浆和线粒体中总抗氧化能力均显著降低（均为 $P<0.01$ ）。化合物 HEP 低、中、高剂量组均可显著升高脑组织匀浆的总抗氧化能力（均为 $P<0.05$ ）；化合物 HEP 低、中、高剂量组均可显著升高胞浆的总抗氧化能力（分别为 $P<0.05, P<0.05, P<0.01$ ）；化合物 HEP 各剂量组均可显著升高脑组织线粒体的总抗氧化能力（分别为 $P<0.05, P<0.05, P<0.01$ ）。

表 7 化合物 HEP 对大鼠 MCAO 引起的局灶性脑缺血损伤脑匀浆总抗氧化能力 (T-AOC) 水平的影响 (UN/mg pr, $\bar{x} \pm s$)

分组	剂量	动物数	总抗氧化能力 (T-AOC)
Sham+NS	2ml/kg	10	1.538 \pm 0.5454
IR+NS	2ml/kg	10	0.907 \pm 0.2056 ^{##}
IR+nim	0.4ml/kg	10	1.706 \pm 0.5614 ^{**}
IR+HEP	15ml/kg	10	1.306 \pm 0.4237 [*]
IR+HEP	30ml/kg	10	1.283 \pm 0.4118 [*]
IR+HEP	60ml/kg	10	1.551 \pm 0.6100 [*]

[#] $P<0.05$, ^{##} 0.01 vs sham 组; ^{*} $P<0.05$, ^{**} 0.01 vs IR 组

表 8 化合物 HEP 对大鼠 MCAO 引起的局灶性脑缺血损伤脑胞浆总抗氧化能力 (T-AOC) 水平的影响 (UN/mg pr, $\bar{x} \pm s$)

分组	剂量	动物数	总抗氧化能力 (T-AOC)
Sham+NS	2ml/kg	10	1.176 \pm 0.301
IR+NS	2ml/kg	10	0.8054 \pm 0.2068 ^{##}
IR+nim	0.4ml/kg	10	1.050 \pm 0.2441 [*]
IR+HEP	15ml/kg	10	1.100 \pm 0.3425 [*]
IR+HEP	30ml/kg	10	1.104 \pm 0.3328 [*]
IR+HEP	60ml/kg	10	1.214 \pm 0.2161 ^{**}

[#] $P<0.05$, ^{##} 0.01 vs sham 组; ^{*} $P<0.05$, ^{**} 0.01 vs IR 组

表 9 化合物 HEP 对大鼠 MCAO 引起的局灶性脑缺血损伤脑线粒体总抗氧化能力 (T-AOC) 水平的影响 (UN/mg pr, $\bar{x} \pm s$)

分组	剂量	动物数	超氧化物歧化酶(SOD)活性
Sham+NS	2ml/kg	10	1.760 \pm 0.3114
IR+NS	2ml/kg	10	1.352 \pm 0.2051 ^{##}
IR+nim	0.4ml/kg	10	3.426 \pm 1.056 ^{**}
IR+HEP	15ml/kg	10	1.585 \pm 0.2712 [*]
IR+HEP	30ml/kg	10	2.007 \pm 0.7558 [*]
IR+HEP	60ml/kg	10	1.888 \pm 0.3014 ^{**}

^{*}P<0.05, ^{##}0.01 vs sham 组; ^{*}P<0.05, ^{**}0.01 vs IR 组

实验六、化合物 HEP 以大鼠大脑中动脉区局灶性脑缺血再灌注损伤脑组织 SOD 含量的影响

结果见表 10、11、12。结果表明大鼠局灶性脑缺血 1 小时, 再灌注 48 小时, 脑组织匀浆、胞浆和线粒体 SOD 水平显著降低 (均为 P<0.01)。化合物 HEP 低、中、高剂量组均可显著升高脑组织匀浆 SOD 水平 (分别为 P<0.05, P<0.05, P<0.01); 化合物 HEP 低、中、高剂量组均可显著升高胞浆中的 SOD 水平 (分别为 P<0.001, P<0.001, P<0.05); 化合物 HEP 各剂量组均可显著升高线粒体 SOD 水平 (分别为 P<0.01, P<0.01, P<0.05)。

表 10 化合物 HEP 对大鼠 MCAO 引起的局灶性脑缺血再灌注损伤脑匀浆超氧化物歧化酶 (SOD) 活性的影响 (UN/mg pr, $\bar{x} \pm s$)

分组	剂量	动物数	超氧化物歧化酶(SOD)活性
Sham+NS	2ml/kg	10	18.26 \pm 6.630
IR+NS	2ml/kg	10	8.992 \pm 2.993 ^{##}
IR+nim	0.4ml/kg	10	20.06 \pm 5.859 ^{**}
IR+HEP	15ml/kg	10	12.43 \pm 2.725 [*]
IR+HEP	30ml/kg	10	13.01 \pm 4.678 [*]
IR+HEP	60ml/kg	10	14.38 \pm 4.863 ^{**}

^{*}P<0.05, ^{##}0.01 vs sham 组; ^{*}P<0.05, ^{**}0.01 vs IR 组

表 11 化合物 HEP 对大鼠 MCAO 引起的局灶性脑缺血再灌注损伤
脑胞浆超氧化物歧化酶 (SOD) 活性的影响 (UN/mg pr, $\bar{x} \pm s$)

分组	剂量	动物数	超氧化物歧化酶(SOD)活性
Sham+NS	2ml/kg	10	35.90 \pm 12.36
IR+NS	2ml/kg	10	21.40 \pm 5.827 ^{##}
IR+nim	0.4ml/kg	10	27.80 \pm 5.611*
IR+HEP	15ml/kg	10	34.10 \pm 6.987**
IR+HEP	30ml/kg	10	35.68 \pm 8.461*
IR+HEP	60ml/kg	10	29.21 \pm 6.925*

*P<0.05, **0.01 vs sham 组; *P<0.05, **0.01 vs IR 组

表 12 化合物 HEP 对大鼠 MCAO 引起的局灶性脑缺血再灌注损伤线粒体超氧化物歧化酶 (SOD) 活性的影响 (UN/mg pr, $\bar{x} \pm s$)

分组	剂量	动物数	超氧化物歧化酶(SOD)活性
Sham+NS	2ml/kg	10	19.66 \pm 8.519
IR+NS	2ml/kg	10	10.02 \pm 2.659 ^{##}
IR+nim	0.4ml/kg	10	15.80 \pm 4.883**
IR+HEP	15ml/kg	10	20.15 \pm 8.777*
IR+HEP	30ml/kg	10	19.55 \pm 8.304**
IR+HEP	60ml/kg	10	13.97 \pm 4.375*

*P<0.05, **0.01 vs sham 组; *P<0.05, **0.01 vs IR 组

实验七、化合物 HEP 对大鼠大脑中动脉区局灶性脑缺血再灌注损伤脑组织细胞凋亡的影响。

结果见表 13。结果表明大鼠脑缺血 1 小时, 再灌注 48 小时, 脑组织凋亡细胞百分率显著升高 (P<0.01), 假手术组未见 G_1/G_0 谷前有明显的特征性亚峰, 即凋亡峰 (AP 峰); 缺血再灌注组可见 G_1/G_0 谷前明显的凋亡峰。化合物 HEP 各剂量组均可显著降低脑组织凋亡细胞百分率 (分别为 P<0.01, P<0.001, P<0.01), 可见凋亡峰降低或消失。

表 13 化合物 HEP 对大鼠 MCAO 引起的局灶性脑缺血
再灌注损伤细胞凋亡的影响 (%， $\bar{x} \pm s$)

分组	剂量	动物数	凋亡细胞率
Sham+NS	2ml/kg	10	0.780 \pm 0.2862
IR+NS	2ml/kg	10	9.592 \pm 1.706 ^{##}
IR+nim	0.4ml/kg	10	6.507 \pm 0.753*
IR+HEP	15ml/kg	10	1.513 \pm 0.3113**
IR+HEP	30ml/kg	10	2.667 \pm 0.7543**
IR+HEP	60ml/kg	10	4.500 \pm 0.9771**

*P<0.05, **0.01 vs sham 组; *P<0.05, **0.01 vs IR 组

实验八、化合物 HEP 对大鼠大脑中动脉区局灶性脑缺血灌注损脑组织 病理学的影响

HE 染色结果显示，各组海马 CA₁ 区神经细胞均分 3~5 层。

I 组 海马组织结构正常，无充血、水肿；锥体细胞和颗粒细胞形态正常，胞浆呈嗜碱性，核仁清晰，无变性、坏死等形态学改变。

II 组 海马可明显充血、水肿，大部分锥体细胞和颗粒细胞核固缩，核周变空，部分神经元坏死，核破碎或消失。

III 组 海马无明显充血、水肿，部分神经元细胞模糊不清，核固缩，少数神经元坏死。

IV 组 海马轻度充血、水肿，形态锥体细胞轻度减少，大部分神经细胞形态接近正常，部分区域细胞有坏死表现。

V 组 海马无明显充血、水肿，部分区域的神经元有水肿，偶可见点状坏死。

VI 组 海马形态结构基本正常，锥体细胞和颗粒细胞形态结构基本正常，胞浆嗜碱性，核仁较清晰。

实验结果表明：

1、羟乙葛根素的毒性甚低，对小鼠口服和腹腔注射的 LD₅₀ 值 > 5g/kg。

2、大鼠大脑中动脉局灶性脑缺血 1 小时，再灌注 48 小时后，血浆内皮素含量明显升高，羟乙葛根素具有降低血浆内皮素水平的作用。

3、大鼠大脑中动脉局灶性脑缺血 1 小时，再灌注 48 小时后，脑组织匀浆、胞浆。线粒体中的丙二醛含量明显升高，羟乙葛根素具有减少脑组织丙二醛含量的作用。

4、大鼠大脑中动脉局灶性脑缺血 1 小时，再灌注 48 小时后脑组织匀浆、胞浆，线体中抗氧化能力 (T-AOC) 明显降低，羟乙葛根素具有提高脑组织总抗氧化能力的作用。

5、大鼠大脑中动脉局灶性脑缺血 1 小时，再灌注 48 小时后，脑组织匀浆、胞浆，线粒体中的超氧化歧化酶 (SOD) 水平明显降低，羟乙葛根素具有提高脑组织超氧化歧化酶水平的作用。

6、大鼠大脑中动脉局灶性脑缺血 1 小时，再灌注 48 小时后，脑组织凋亡细胞的比例明显升高，羟乙葛根素具有降低缺血脑组织凋亡细胞百分率的作用。

7、病理组织学检查结果表明，大鼠大脑中的动脉局灶性脑缺血 1 小时，再灌注 48 小时后，海马 CA₁ 区细胞明显受损，羟乙葛根素可显著改善脑组织的缺血和坏死表现。

所以羟乙葛根素可用于制备治疗脑血管病的新药。用羟乙葛根素制成治疗脑血管病的注射液、粉针剂及羟乙葛根素口服制剂，如羟乙葛根素片剂、胶东剂等。

下面再用一个实际例子对本发明作进一步说明。

取葛根薄片 50kg，置多效提取罐内，加入乙醇 150kg，提取 2 次，每次 1 小时回收乙醇，将浸膏以水饱和的正丁醇提取至无葛根素止。通过酸性氧化铝柱，回收后的提取物，以冰醋酸结晶得粗品 5kg，再以乙醇重结晶，得纯品 1kg，收率约 2%，含量 ≥97.0%。将此葛根素溶于 NaOH 中，通入环氧乙烷，在 90° 反应 4 小时，放冷，加水放置过夜，得羟乙葛根素粗品，以乙醇重结晶，并经反相柱层析得纯品，含量 97.0% 以上。

经质量检验合格后，在无菌条件下分装于 10ml 青霉素安瓶中，每支 20mg，在 105°C 消毒 20 分钟，即得注射用羟乙葛根素 (粉针)。也可按注射液常规制法，取羟乙葛根素，加注射用水溶解，加热消毒，必要时得加适宜的助溶剂，配成 2% 溶液，滤过，灌封于预先处理好的安瓶内，熔封，包装，测定含量，即得羟乙葛根素注射液。规格，5ml：100mg 或 2ml：40mg。

也可按常规方法，分别制成片剂及胶囊剂。羟乙葛根素片，每片 0.1g。羟乙葛根素胶囊，每粒 0.1g。

使用时，粉针剂先加无菌用水 10ml 溶解后，加入输液内静脉滴注；注射液直接注入输液内，静脉滴注，一日 10-200mg；片剂及胶囊剂一日三次，每次 100mg，或遵照医嘱服用。

本发明从中药葛根中提取葛根素，并在葛根素基础上通过羟乙基化引入侧链，把葛根素改造成具生理活性的羟乙葛根素。经实验证实这种化合物增加了脂溶性，可以提高其血药浓度，并可提高其血脑屏障通过率，从而其对脑血管病的治疗效果明显好于葛根素，所以本发明的羟乙葛根素是适用于制造治疗脑血管病新药的优选化合物。

